

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

特許第3403066号
(P3403066)

(45) 発行日 平成15年 5 月 6 日 (2003. 5. 6)

(24) 登録日 平成15年 2 月 28 日 (2003. 2. 28)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

C 0 7 K 14/475

1/18

1/34

14/515

// C 0 7 K 14/65

C 0 7 K 14/475

1/18

1/34

14/515

14/65

請求項の数17(全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-122645

(22) 出願日 平成10年 3 月 26 日 (1998. 3. 26)

(65) 公開番号 特開平11-21299

(43) 公開日 平成11年 1 月 26 日 (1999. 1. 26)

審査請求日 平成11年 3 月 26 日 (1999. 3. 26)

(31) 優先権主張番号 P 1 0 0 5 6 7 7

(32) 優先日 平成 9 年 3 月 27 日 (1997. 3. 27)

(33) 優先権主張国 オランダ (NL)

前置審査

(73) 特許権者 598062480

カムピナ メルクニ ビー ブイ

オランダ国 5301 エルビー ザルトボ

ムメル ホゲウエグ 9 番地

(72) 発明者 クラース ダニエル クッセンドラッガ
ー

オランダ国 5467 ディーエヌ ヴェゲ

ールエクステルドンク 17 番地

(72) 発明者 マリナス ゲラルダス コーネリス キ
ヴィッツ

オランダ国 5482 シーシー シイイン

デルアイケンストラート 50 番地

(74) 代理人 100075557

弁理士 西教 圭一郎 (外 2 名)

審査官 坂崎 恵美子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 牛乳あるいは牛乳誘導物から細胞増殖因子あるいは 1 種または 2 種以上の細胞増殖因子を含む組成物を回収する方法

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 牛乳あるいは牛乳誘導体から少なくとも 1 つの細胞増殖因子をカチオン交換体に吸着させ、次いで該カチオン交換体を分別溶出させて細胞増殖因子分に富む少なくとも 1 つの画分を得、この画分を 3. 5 から 4. 5 以下の pH で後処理することを特徴とする牛乳あるいは牛乳誘導体から 1 種あるいはそれ以上の細胞増殖因子を回収する方法。

【請求項 2】 前記画分の後処理が 4 から 4. 5 以下の pH で行なわれる請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 前記画分の後処理が脱塩又は濃縮である請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】 脱塩が限外濾過あるいは電気透析により行なわれる請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】 濃縮がカチオン交換体に再度吸着させ分

別溶出を行なうことにより実施せられ、

後処理が画分中に存在する細菌の殺菌又は除去を含む請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】 濃縮がカチオン交換体に再度吸着させ分別溶出を行なうことにより実施せられ、後処理が画分中に存在する細菌の殺菌及び除去を含む請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】 牛乳あるいは牛乳誘導体がカチオン交換体に吸着せしめられる前に予め脱脂せられる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】 牛乳あるいは牛乳誘導体の脱脂が、0. 1 ~ 1 0 μ m の開孔を有するフィルターを用いる精密濾過により実施せられる請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】 牛乳あるいは牛乳誘導体が予め短時間加熱処理せられる請求項 8 に記載の方法。

【請求項10】 濃縮がカチオン交換体に再度吸着させ分別溶出を行なうことにより実施せられ、少なくとも1つの細胞増殖因子のカチオン交換体への吸着が、牛乳あるいは牛乳誘導体を大なる表面速度及び大なる液荷重でカチオン交換体を充填したカラム中に通過させることにより実施せられる請求項3に記載の方法。

【請求項11】 濃縮がカチオン交換体に再度吸着させ分別溶出を行なうことにより実施せられ、細胞増殖因子に富む画分を分取する前にラクトパーオキシダーゼに富む少なくとも1つの画分が回収せられ、ラクトパーオキシダーゼに富む少なくとも1つの画分あるいはラクトフェリンに富む少なくとも1つの画分がさらに後処理されてラクトパーオキシダーゼあるいはラクトフェリン製品が作られる請求項3に記載の方法。

【請求項12】 濃縮がカチオン交換体に再度吸着させ分別溶出を行なうことにより実施せられ、細胞増殖因子に富む画分を分取する前にラクトパーオキシダーゼに富む少なくとも1つの画分が回収せられ、ラクトパーオキシダーゼに富む少なくとも1つの画分あるいはラクトフェリンに富む少なくとも1つの画分がさらに後処理されてラクトパーオキシダーゼおよびラクトフェリン製品が作られる請求項3に記載の方法。

【請求項13】 濃縮がカチオン交換体に再度吸着させ分別溶出を行なうことにより実施せられ、細胞増殖因子に富む画分を分取する前にラクトパーオキシダーゼに富む少なくとも1つの画分が回収せられ、細胞増殖因子に富む画分を分取した後にラクトフェリンに富む少なくとも1つの画分が回収せられる請求項3記載の方法。

【請求項14】 細菌が精密濾過で除去せられる請求項5または6記載の方法。

【請求項15】 画分がさらに噴霧乾燥あるいは凍結乾燥せられる請求項14に記載の方法。

【請求項16】 牛乳あるいは牛乳誘導体から少なくとも1つの細胞増殖因子をカチオン交換体に吸着させ、次いで該カチオン交換体を分別溶出させて細胞増殖因子分に富む少なくとも1つの画分を得、この画分を4から

4.5以下のpHで後処理し、前記画分の後処理が脱塩及び濃縮であり、脱塩が限外濾過あるいは電気透析により行なわれ、濃縮がカチオン交換体に再度吸着させ分別溶出を行なうことにより実施せられ、後処理が画分中に存在する細菌の殺菌及び除去を含み、細菌が精密濾過で除去せられ、画分がさらに噴霧乾燥あるいは凍結乾燥せられ、細胞増殖因子に富む画分が高速タンパク液体クロマトグラフ法を用いて分取せられ、アンジオゲニン又はアンジオゲニン誘導のペプチドに富む少なくとも1つの画分が回収せられることを特徴とする牛乳あるいは牛乳誘導体から1種あるいはそれ以上の

細胞増殖因子を回収する方法。

【請求項17】 牛乳あるいは牛乳誘導体から少なくとも1つの細胞増殖因子をカチオン交換体に吸着させ、次いで該カチオン交換体を分別溶出させて細胞増殖因子分に富む少なくとも1つの画分を得、この画分を4から4.5以下のpHで後処理し、前記画分の後処理が脱塩及び濃縮であり、脱塩が限外濾過あるいは電気透析により行なわれ、濃縮がカチオン交換体に再度吸着させ分別溶出を行なうことにより実施せられ、後処理が画分中に存在する細菌の殺菌及び除去を含み、細菌が精密濾過で除去せられ、画分がさらに噴霧乾燥あるいは凍結乾燥せられ、細胞増殖因子に富む画分が高速タンパク液体クロマトグラフ法を用いて分取せられ、アンジオゲニン及びアンジオゲニン誘導のペプチドに富む少なくとも1つの画分が回収せられることを特徴とする牛乳あるいは牛乳誘導体から1種あるいはそれ以上の細胞増殖因子を回収する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は牛乳あるいは牛乳誘導物から細胞増殖因子あるいは1種または2種以上の細胞増殖因子を含む組成物を回収する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】牛乳は、所謂マクロ栄養素（脂肪、タンパク質、炭化水素）以外に特殊機能を有する多数の微量成分を含む。それらの内最もよく知られているものはラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼであるが、各種の細胞増殖因子もまたこの微量成分に属している。

【0003】ラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼは工業的規模で牛乳あるいは乳製品から多量に回収し得る。米国特許第5,596,082号には、牛乳あるいは牛乳生成物をカチオン交換体に大なる表面速度（時間当たり500cm以上）で且つ大なる液荷重（時間当たり100～600ベッドボリューム）で通過させてラクトフェリン及びラクトパーオキシダーゼをカチオン交換体に吸着させ、次いで該カチオン交換体を各種濃度の多数の塩溶液で溶出せしめる方法が記載されている。こうしてラクトフェリン含有画分とラクトパーオキシダーゼ含有画分が得られ、それを更に常法で処理するのである。

【0004】牛乳および牛乳誘導物中に存在する細胞増殖因子群はそれぞれ異なる極めて特異的な作用活性を有している。これらの作用、その特性は細胞増殖因子の名称により示されていることが多い、は人で有効である。傷での皮膚回復促進に上皮細胞増殖因子（EGF）を用いることが提案されている。インスリン様成長因子（IGF）は骨形成代謝で重要な役割を果たすものと考えられている。血管細胞増殖を誘因すると考えられているア

ンジオゲニンも細胞増殖因子群に属するものと考えられている。

【0005】牛乳中に存在する細胞増殖因子の研究がデーシェイムスによりエンドクリンレギュレーションズ 28巻(1994)、3-8頁に、またシーイーグロヴェノア等によりエンドクリン レビューズ 14巻(1992)710-728頁に記載されている。後者にはさらに、牛乳中に存在するホルモン類の定性的研究も報告されている。

【0006】文献には牛乳からラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼ以外の他の微量成分を単離するための種々の方法が記載されている。

【0007】欧州特許0556083号には所謂分泌成分を単離する方法が記載されている。この方法に従えば、牛乳あるいは牛乳誘導物がカチオン交換体に吸着せしめられ、次いで各種濃度の塩溶液で溶離せしめることにより種々の画分が得られる。分泌成分を含む画分以外に、この方法でラクトフェリン含有画分およびラクトパーオキシダーゼ含有画分が得られる。しかしながら吸着に長い接触時間が必要であること、および処理量割合が低いためこの方法は工業的实施には適していない。

【0008】WO-A-95/26984には予め加熱されたチーズホエーあるいはスキムミルクから出発しウシインスリン様成長因子-1を含む組成物を製造する方法が記載されている。しかしながらこの方法で単離せられる細胞増殖因子の種類ならびに量は限られている。

【0009】欧州特許0489884号には細胞増殖因子が天然に多い原料である初乳から細胞増殖因子を単離する方法が記載されている。この方法では種々のカラムパッキングを用いた多数の連続クロマトグラフ工程群を必要とする。この方法に従えば、存在する細胞増殖因子の半分しか回収し得ないようである。

【0010】WO-A 9529933にはpH 2-3での酸変成細胞増殖因子の単離が記載されている。この方法では、所望の、しかしまた特に望ましくはなる変成が生じる。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】そこで牛乳あるいは牛乳誘導物から1種あるいは2種以上の細胞増殖因子を高収率で回収する方法を提供することが本発明目的である。本発明の別の目的は牛乳あるいは牛乳誘導物から1種あるいは2種以上の細胞増殖因子を回収する方法であって、ラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼの工業的回収方法と組み合わせることが出来、しかもラクトフェリンならびにラクトパーオキシダーゼの収率になんら悪影響を及ぼすことなく細胞増殖因子の回収が可能である方法を提供するにある。

【0012】かかる目的達成の可能性ある方法はカチオン交換体に牛乳あるいは牛乳誘導物から細胞増殖因子群

を吸着させ、次いでこのカチオン交換体の分別溶離を実施するものであろう。しかしながら、こうして得られる細胞増殖因子に富む画分の後処理に問題のあることが判明した。

【0013】カチオン交換体に吸着させ、次いで溶出せしめた画分は通常いくつかの後処理、例えば脱塩、濃縮、存在する細菌の除去および／または殺菌、乾燥に付される。こう言った処理を行うと一方では許容し難いほど多量の細胞増殖因子が失われ、また他方ではフィルター、イオン交換体等上記処理を実施するに要する装置を極短時間使用した後、常にクリーニングするおよび／または取り替える必要があることが判っている。

【0014】従って、本発明のさらに別の目的は牛乳あるいは牛乳誘導物から1種あるいは2種以上の細胞増殖因子を回収する方法で、細胞増殖因子に富む画分の後処理で細胞増殖因子の収率に殆ど影響しないような方法を提供するにある。さらに別の目的は細胞増殖因子を、それらが牛乳中に天然に存在するままの形で、変成なくあるいは実質的に変成を生じることなく単離せしめることにある。

【0015】

【課題を解決するための手段】本発明は前記の後処理をpH3.0より大なる弱酸性条件下で実施すると上述の諸目的が達成せられるとの驚くべき発見に基づいている。本発明に従えば、牛乳あるいは牛乳誘導物から少なくとも1種の細胞増殖因子をカチオン交換体に吸着させ、このカチオン吸着体を分別溶出せしめて細胞増殖因子群に富む少なくとも1つの画分を得、次いでこの画分を3.5から4.5以下のpHで後処理することにより、上記諸目的が後処理で通常認められる問題なしに、達成せられるのである。

【0016】

【発明の実施の形態】本発明に従い、細胞増殖因子に富む画分の処理をpH少なくとも3.5、より好ましくは4から4.5以下で実施すると上述の諸問題は生ぜず、従って後処理で細胞増殖因子の損失が無く、細胞増殖因子の収率が極めて大となることが見いだされている。また後処理で細胞増殖因子の変成は生ぜず、あるいは極めて少ない。フィルター(もし、使用した場合)、および／またはイオン交換体は、沈泥でうまることが無く、従って長時間使用可能である。驚くべきことに酸性条件下で作業しても細胞増殖因子ならびにその収率に殆どなんらの悪影響も及ぼさない。

【0017】本発明方法の出発物質として適当なものは細胞増殖因子群を含む牛乳ならびに牛乳誘導物、例えばチーズホエー、あるいはカゼインホエーである。好ましい出発物質は牛乳である、というのは牛乳は多量の細胞増殖因子を含み且つ大量に入手可能であるからである。

【0018】好ましくは、出発物質は先ず最小限の加熱処理に付される。かかる加熱処理で牛乳中に自然に存在

10

20

30

40

50

する細菌の大部分が殺されるのでこの処理が有利である。この最小限の加熱処理は最大80℃迄の温度で数秒間以内の加熱を意味する。

【0019】また 出発物質を吸着並びに溶出工程に付すに先立ちストリッピングして脂肪を除去することが極めて有利である。脱脂後はカチオン交換体を充填したカラムが、カチオン交換体への吸着工程中で油よごれあるいは目づまりすることがないことが見いだされた。これはカラムの望ましからざる圧力増大並びに吸着サイクルの望ましからざる短縮を防止する。

【0020】精密濾過により脱脂することが好ましい、というのはこうすると出発物質の微生物汚染を同時に減少せしめうるからである。ここで精密濾過とは0.1～10μmの開孔を有するフィルターを用いての濾過を意味する。

【0021】牛乳あるいは牛乳誘導物からの成分が吸着せしめられるカチオン交換体は当業者周知の任意の通常のカチオン交換体でありうる。平均粒子径が100μm以上で、高压に耐える十分な機械的強度を有するカチオン交換体を用いることが好ましい。そうすると、カチオン交換体は結合力を保持しつつ高い液体荷重に耐え、従って工業的实施可能な方法に要求せられる大量の液体を、所望の短時間内に圧入することができるとの利点が得られる。好適なカチオン交換体の例はトーヨーパール MD-P SP, SP-トーヨーパール、SP-セファローズおよびセファローズ ビッグ ビーズである。

【0022】好ましくは、カチオン交換体はpH5.5～7.5のフォスフェート バッファーで予め調整しておく。牛乳あるいは牛乳誘導物を例えばポンプ送りでカチオン交換体充填カラム中に送り込み、微量成分を出発物質からカチオン交換体に吸着せしめる。この吸着は10℃以下の温度で実施し、細菌繁殖を最小限ならしめることが好ましい。

【0023】本発明の好ましい一具体例によれば、出発物質が大なる表面速度（毎時500cm以上）で且つ大なる液体荷重（毎時100～600 ベッド ボリューム）で、上記米国特許第5,596,082号記載の如く、平均粒子径100～300μmのカチオン交換体上にポンプ送りされる。この具体例に従えば工業的規模での実施が可能で経済的見地から極めて有利な吸着が実施せられる。

【0024】この吸着工程の後、カチオン交換体充填カラムをpH5.5～7.5にバッファーされ、塩濃度0.2モル以下の塩（NaCl）溶液で洗浄して残存牛乳（出発物質）を洗い流すことが好ましい。

【0025】出発物質をイオン交換樹脂に吸着させた後、分別溶出が実施せられる。この場合種々の溶離液で順次溶出がおこなわれ、種々の微量成分組成物を含む多数の画分が得られる。

【0026】好ましくはpH5.5～7.5、好ましく

は約6.5にバッファーされた各種塩溶液を用い少なくとも3つの溶離工程が実施せられる。塩濃度を順次高とした塩溶液を使用することにより牛乳あるいは牛乳誘導物からの別々の微量成分に富む画分が順次得られる。

【0027】低NaCl濃度例えば0.15～0.25モルの溶液で溶出せしめると実質的にラクトパーオキシダーゼを含む画分が得られる。次により高濃度例えば0.25～0.5モルのNaCl溶液で溶出せしめると細胞増殖因子に富む画分で、少量のラクトパーオキシダーゼおよびラクトフェリンを含むものが得られる。最後により高濃度例えば0.7～1.2モルのNaCl溶液を用い溶出せしめると、実質的にラクトフェリンを含む画分が得られる。

【0028】これら画分は例えばモノーS-カラムを用いるFPLC、高速タンパク質液体クロマトグラフィーで特徴づけられる。所望によりこのFPLCは調整スケールで、得られた画分を更に精製するために使用することができる。

【0029】実質的にラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼをそれぞれ含む画分は、常法でさらに処理せられる。こう言った方法は脱塩、濃縮、細菌除去ならびに乾燥工程からなる。このように、本発明方法は牛乳あるいは牛乳誘導物からラクトフェリンならびにラクトパーオキシダーゼを工業的規模で回収する方法と極めて有利に組み合わせることができる。

【0030】すでに述べた如く、本発明方法では分別溶出で得られる細胞増殖因子に富む画分が4.5以下の弱酸性pHでさらに処理せられることが重要である。好ましくは、細胞増殖因子に富む画分は少なくとも4のpHで後処理せられる、というのはこうすると細胞増殖因子の収率が大となるからである。上記pHは溶離液を塩酸、あるいは細胞増殖因子に悪影響を及ぼさない他の酸で酸性化することにより達成せられる。好ましくは食品に許容せられる酸が用いられる。

【0031】細胞増殖因子に富む画分に対して施される後処理の1つは脱塩である。塩溶液を用いて溶出した後、所望の細胞増殖因子を含む画分はかなり多量の塩、特にNaClを含んでいる。細胞増殖因子の多くの用途においてこういった塩の存在は望ましくない。脱塩処理は限外濾過あるいは電気透析により実施せられる。限外濾過とは2.5kDa以下の膜での濾過を意味する。本発明の非常に有利な点は細胞増殖因子に富む画分中に形成せられる沈殿物の存在で限外濾過膜の目づまりが生じる危険性が無いという点である。

【0032】後処理に通常含まれる別の処理は細胞増殖因子に富む画分の精製あるいは濃縮である。この精製工程は好ましくはカチオン交換体を使用する第2のクロマトグラフィー工程からなる。この工程では画分中に存在するラクトパーオキシダーゼおよびラクトフェリンが細胞増殖因子から分離せられる。第2のクロマトグラフィー

10

20

30

40

50

工程を採用することは、加熱ならびに分離により不活性化されて、ラクトフェリンならびにラクトパーオキシダーゼを除去する際にしばしば認められる、細胞増殖因子がラクトフェリンならびにラクトパーオキシダーゼに付随して失われることが無くなるので有利である。

【0033】NaCl濃度0.15~0.25モルの溶液で調整されたカチオン交換体に細胞増殖因子に富む画分を適用すると、通過液体に、なを存在する全てのラクトパーオキシダーゼが含まれるようになることが見いだされた。0.4~0.7および0.8~1.2モル濃度のNaCl溶液で順次溶出を進めると、2つの画分が得られる。これらのうち最初のものは事実上細胞増殖因子のみを含み、第2のものにはかなり純度の高いラクトフェリンを含む。

【0034】細胞増殖因子に富む画分の後処理の一部をなす第3の処理はその中に存在する細菌の除去および／または殺菌である。好ましくは細菌は精密濾過で除去せられる。というのは児の場合生成物の損失あるいは不活性化がないからである。

【0035】細胞増殖因子に富む画分に適用せられる第4の処理は得られる生成物の品質を保持する目的での乾燥である。好ましい乾燥法は霧霧乾燥あるいは凍結乾燥である。

【0036】得られる細胞増殖因子に富む画分中に存在する各種の細胞増殖因子を分離する必要がある場合には、この画分は第5の処理に付される。かかる分離工程は例えば分取FPLCにより実施せられる。

【0037】分別溶出の後、本発明で得られる細胞増殖因子に富む画分の後処理のそれぞれ一部をなす上述の5つの処理は、任意の順番で実施せられる。いかなる場合にもこの5つの処理の全てを実施せねばならぬというわけではない。どの操作をいかなる順で実施すべきかは、当業者により原料物質に応じ容易に決定しうる。しかしながら、本発明ではこれら5つの処理のいずれに於いても、細胞増殖因子に富む画分中に固形分を生じるといった前述の問題を起こすことはない。

【0038】最後に、本発明は上記方法を利用して得られる細胞増殖因子、または1種あるいは2種以上の細胞増殖因子を含む組成物、ならびにラクトパーオキシダーゼ、ラクトフェリン、あるいはラクトパーオキシダーゼまたはラクトフェリンを含む組成物に関する。

【0039】

【実施例】次に本発明方法を下記実施例により具体的に説明する。

【0040】（実施例1）直径1.6メートルのイオン交換カラムに200リットルの粗粒子（100~300μm）カチオン交換体（Sーセファローズ ビッグ ビーズ、ファーマシア社製品）を充填し床高10センチメートルの交換体カラムを作った。このカラムをフォスフェートバッファー（pH=6.5, 0.025モルフォ

スフェート）で調整した。このカラム中に限外濾過低脂肪牛乳を毎時100ベッド ボリュームの割合で3時間ポンプ送りし、全量60,000リットルの牛乳を処理した。

【0041】次いで、このカラムを、バッファーされた（pH=6.5）0.1モルNaCl溶液の5ベッド ボリュームで洗浄した。次にこのカラムに吸着されている微量成分を

a) 0.2 モルNaCl溶液 5ベッド ボリューム

b) 0.3 モルNaCl溶液 5ベッド ボリューム

c) 1.0 モルNaCl溶液 5ベッド ボリューム

で順次溶出せしめた。

【0042】実質的にラクトパーオキシダーゼおよびラクトフェリンをそれぞれ含む溶離液a) およびc) はpH6.5で限外濾過により脱塩し乾燥せしめた。ラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼの残さと細胞増殖因子を含む溶離液b) は塩酸でpH4に酸性化し、2.5kDa膜（コッホから入手可能）を用い2.5mSの導電率になるまで（容積還元率99%）限外濾過した。

【0043】精密濾過の後、pH6.5に中和し、ついで乾燥し、FPLC分析した。クロマトグラム（図1）にはラクトパーオキシダーゼのピーク（13.233分）とラクトフェリンのピーク（29.428分）が明瞭にみられ、また細胞増殖因子のピーク（14.782~19.011分）も認められた。

【0044】（実施例2）実施例1に記載した条件と同じ条件下に生低脂肪牛乳から0.3モルNaCl溶出液を得た。

【0045】この溶出液を直径1.6センチメートルのカラムに、40mlのカチオン交換体（Sーセファローズ）を充填し、pH6.5の0.2モルNaCl溶液で調整した第2のカラムを用いる第2クロマトグラフィ工程に付した。前記溶出液はこのカラムに毎時10ベッド ボリュームの割合でポンプ送りされた。通過せる液にはラクトパーオキシダーゼが含まれ、他方細胞増殖因子とラクトフェリンはこのカラムに吸着された。

【0046】次に0.55モルNaCl溶液（全量で5ベッドボリューム）と1モルNaCl溶液を用い順次溶出せしめた。後の溶離液にはラクトフェリンが含まれていた。0.55モルNaCl溶液での溶離液を塩酸でpH4に調節し、導電率2.5mSまで限外濾過した。

【0047】FPLC（図2）でのクロマトグラフによる同定法で、この生成物にはラクトフェリンおよび／またはラクトパーオキシダーゼが殆ど全く含まれていないことが判った。10.202から17.698分のピークは全て細胞増殖因子である。

【0048】かくして得られた生成物をモノーSーカチオン交換体カラム5X5を用いて分離した。溶出は下記の2つのバッファーを用いて実施した。

バッファーA：0.025モル Na_2HPO_4 ，pH 6.5

バッファーB：0.025モル Na_2HPO_4 ，2モル NaCl ，pH 6.5

その他の条件：サンプル荷重 2.5ml (6.2mg)；検出 220nm，溶出 $t=0$ 分 0%バッファーB， $t=30$ 分 50%バッファーB

【0049】5画分を捕集し、これらを更に逆相カラムで分離した。条件は：

カラム：ハイパー318 4.6X250 ビオラッド

バッファーA：10ml アセトニトリル，1000ml ミリ Q水，1ml トリフルオロ酢酸

バッファーB：600ml アセトニトリル，400ml ミリ Q水，1ml トリフルオロ酢酸，

検出 220nm，サンプル荷重 $100\mu\text{l}$ ，溶出： $t=0$ 分 0%バッファーB； $t=60$ 分 85%バッファーB

【0050】2つのこれら分離物の高速液体クロマトグラムが図3および図4に示されている。図3はアンジオゲニン画分（これは質量分析ならびにN-末端シーケンス分析で完全に純粋であることを確認）のクロマトグラムである。図4は別の画分で質量分析ならびにN-末端シーケンス分析からアンジオゲニンペプチドを含むものと思われる画分のクロマトグラムである。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明方法で得られるラクトパーオキシダーゼ、ラクトフェリン及び細胞増殖因子を含む画分の高速タンパク質液体クロマトグラフチャート

【図2】本発明方法で得られる細胞増殖因子群のみを含む画分の高速タンパク質液体クロマトグラフチャート

【図3】本発明方法で得られるアンジオゲニン画分の高速液体クロマトグラフチャート

【図4】本発明方法で得られるアンジオゲニンペプチドを含む画分の高速液体クロマトグラフチャート

【図1】

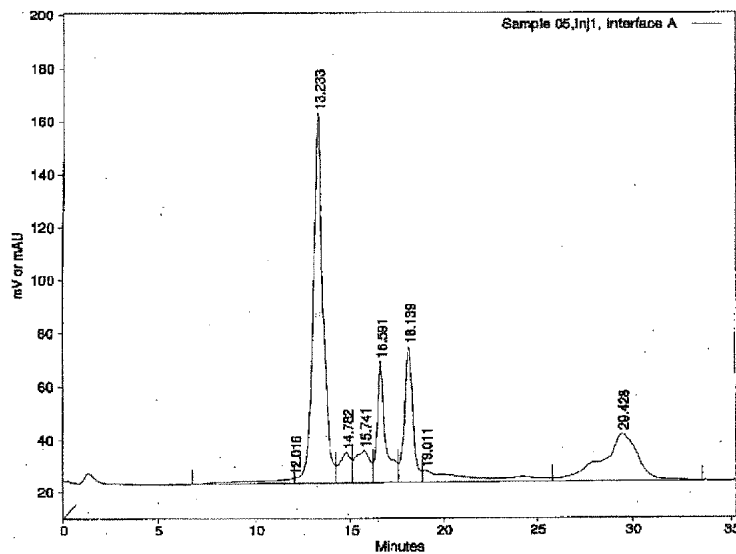


Figure 1

【図2】

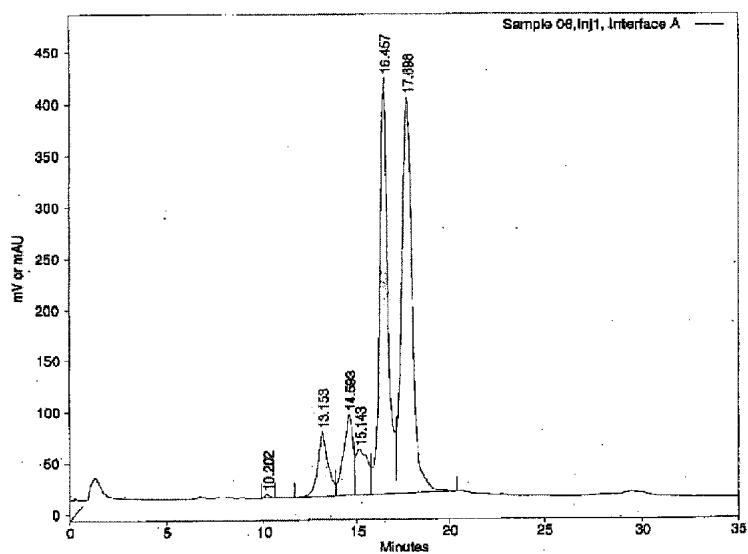


Figure 2

【図3】

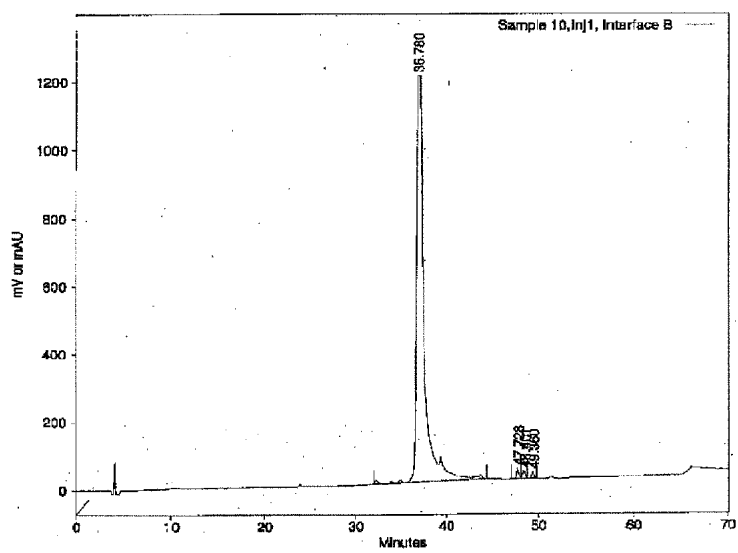


Figure 3

【図4】

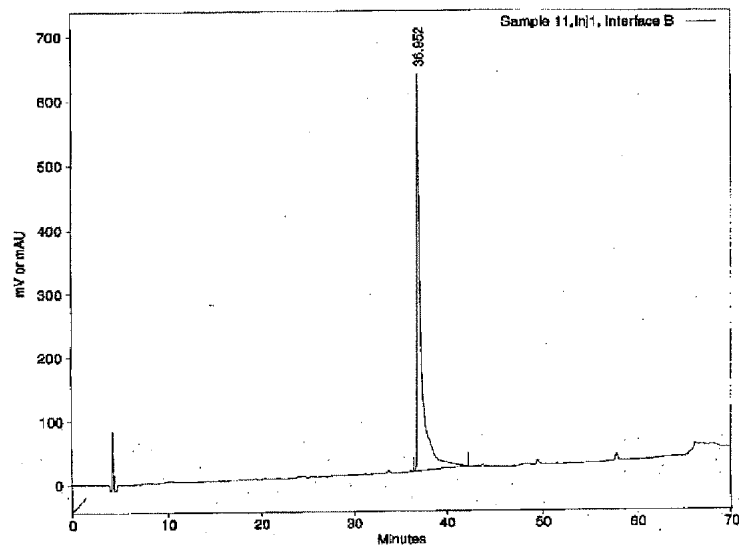


Figure 4

フロントページの続き

(51) Int.C1. ⁷ C 1 2 N 9/08	識別記号	F I C 1 2 N 9/08
(72)発明者 ハーバート カーレル レメン オランダ国 5423 ティーピー ハンデルボスカント 13番地 (72)発明者 テオドールス ヨハネス アントニア マリア ヴァン ケッセル オランダ国 5476 ヴィビー ヴォルス テンボッシュカムプウェッグ 19番地	(58)調査した分野(Int.C1. ⁷ , D B名)	C07K 14/47 C07K 1/18 C07K 1/34 C07K 14/515 C07K 14/485 C07K 14/79 C07K 14/65 C12N 9/08 CA/BIOSIS/MEDLINE/W PIDS (STN)
(56)参考文献 特表 平9-512536 (J P, A) Biochem. J., Vol. 251, p. 95-103 (1988)		

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-021299

(43)Date of publication of application : 26.01.1999

(51)Int.Cl. C07K 14/47
C07K 1/18
C07K 1/34
C07K 14/79
C12N 9/08

(21)Application number : 10-122645

(71)Applicant : CAMPINA MELKUNIE BV

(22)Date of filing : 26.03.1998

(72)Inventor : KUSSENDRAGER KLAAS DANIEL
KIVITS MARINUS GERARDUS C
LEMMEN HUBERT KAREL
VAN KESSEL THEODORUS
JOHANNES A M

(30)Priority

Priority number : 97 1005677 Priority date : 27.03.1997 Priority country : NL

(54) RECOVERY OF CELL-PROLIFERATING FACTOR OR COMPOSITION CONTAINING ONE OR MORE KINDS OF CELL-PROLIFERATING FACTORS FROM MILK OR MILK DERIVATIVE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To profitably obtain a cell-proliferating factor by allowing a cation exchanger to adsorb the cell-proliferating factor from milk (derivative), eluting the adsorbed substance, and subsequently post-treating the obtained fraction rich in the cell-proliferating factor at a specific acidic pH.

SOLUTION: This method for recovering a cell-proliferating factor or composition comprises passing milk or its derivative through a cation exchange column, eluting at least one kind of cell-proliferating factor adsorbed to the cation exchanger with a 0.2 M NaCl solution, a 0.3 M NaCl solution and 1.0 M NaCl solution, collecting a fraction eluted with the 0.3 M NaCl solution as a fraction rich in the cell-proliferating factor, post-treating the fraction at a pH of at least 3.5-4.5, and further subjecting the treated fraction to a desalting treatment and/or a concentration treatment by an ultrafiltration method, an electrophoresis method, etc. Thus, one or more kinds of cell-proliferating factors are profitably obtained from the milk or the milk derivative.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 26.03.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 21.05.2002

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3403066

[Date of registration] 28.02.2003

[Number of appeal against examiner's decision of rejection] 2002-15819

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection] 19.08.2002

[Date of extinction of right]